

文章编号 1004-924X(2014)11-2902-06

基于纳米银粒子增强荧光测定鸭肉中土霉素残留量

赵进辉,袁海超,洪 茜,彭义杰,李 耀,刘木华*

(江西农业大学 工学院 生物光电及应用重点实验室,江西 南昌 330045)

摘要:在纳米银粒子(AgNPs)和乳化剂 OP-10 的作用下,土霉素(OTC)与 Eu(III)生成的配合物可产生较强的荧光强度,本文将此荧光增强机理用于检测鸭肉中残留的 OTC。首先,分析了 OTC+Eu+AgNPs+OP-10 体系和 OTC+Eu+AgNPs+OP-10+duck meat extract 体系的荧光光谱特性。然后,分别分析了 AgNPs 加入量、Eu³⁺ 加入量、乳化剂 OP-10 和反应时间对 OTC+Eu+AgNPs+OP-10+duck meat extract 体系的荧光强度的影响,确定了最佳实验条件。最后,建立了预测鸭肉中 OTC 残留量的标准曲线。实验结果显示:鸭肉提取液中 OTC 含量与 617 nm 处峰面积之间呈良好的线性关系,其预测集的相关系数(r)和预测均方根误差(RMSEP)分别为 0.996 6 和 0.622 3 mg/L。该结果表明,提出的研究方法可满足鸭肉中 OTC 残留量的快速测定要求。

关键词:光谱检测;土霉素;表面增强荧光;纳米银粒子;鸭肉;铕

中图分类号:O657.31;O433.4 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20142211.2902

Determination of oxytetracycline content in duck meat using silver nanoparticle enhanced fluorescence

ZHAO Jin-hui, YUAN Hai-chao, HONG Qian, PENG Yi-jie, LI Yao, LIU Mu-hua*

(*Optics-Electrics Application of Biomaterials Laboratory, College of Engineering,
Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China*)

* Corresponding author, E-mail: suikelum@sina.com

Abstract: Under the action of silver nanoparticles (AgNPs) and emulsifier (OP-10), the complexes generated from oxytetracycline (OTC) and Eu (III) produce strong fluorescence intensity. This mechanism of fluorescence enhancement was used to detect the oxytetracycline (OTC) content in duck meat in this paper. Firstly, the fluorescence spectral properties of OTC+Eu+AgNPs+OP-10 system and OTC+Eu+AgNPs+OP-10+duck meat extracting system were analyzed. Then, the effects of the addition amounts of AgNPs, Eu³⁺, emulsifier OP-10 and the reaction time on the fluorescence intensity of OTC+Eu+AgNPs+OP-10+duck meat extracting system were investigated respectively, and the optimal experimental conditions were determined. Finally, the standard curve for predicting the OTC content in the duck meat was established. The experimental results show that it is a good linear relationship between the OTC concentration in the duck meat extract and the peak area at 617 nm, and the correlation coefficient(r) and the Root Mean Squared Error of Prediction (RMSEP)

收稿日期:2014-04-14;修订日期:2014-05-04.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 31101295);江西省科技厅对外科技合作计划资助项目(No. 20132BDH80005);江西省科技厅科技支撑计划资助项目(No. 20121BBG70058);江西省教育厅科技计划资助项目(No. GJJ12244)

are 0.996 6 and 0.622 3 mg/L respectively. It is demonstrated that the proposed method is suitable for detecting the OTC contents in the duck meat.

Key words: spectroscopy detection; oxytetracycline; surface enhanced fluorescence; silver nanoparticle; duck meat; europium

1 引 言

土霉素(Oxytetracycline, OTC)作为一种广谱四环素类抗生素药物,常被用于预防和治疗家禽疾病。对家禽用药,需严格遵循用药量的规定,否则极易在禽肉中残留 OTC,从而危害人们的身体健康。中国对禽肉中 OTC 的残留量已有严格规定,如鸭肉中 OTC 残留量不能超过 0.1 mg/kg^[1]。为严格遵守这一规定,家禽中 OTC 残留量的检测工作非常重要。目前,微生物法^[2-3]、酶联免疫分析法^[4-6]和理化检测法^[7-8]等常规抗生素残留检测方法虽然检测精度较高,但存在前处理过程繁琐,耗时长等缺点,因此这些检测方法无法满足快速检测鸭肉中 OTC 残留量的要求。

基于贵金属纳米粒子的表面增强荧光(Surface Enhanced Fluorescence, SEF)可使荧光强度增强十几倍以上,在生物医疗诊断、生物传感器、化学分析等方面均得到了应用^[9-11]。Tan 等应用纳米银粒子(AgNPs)增强 EuTc 配合物荧光的方法来检测牛奶中的四环素^[10]。徐良敏等分析了纳米金胶体颗粒对吡啶橙水溶液的荧光增强效应^[9]。OTC 与 Eu(III)生成的配合物在 AgNPs 的作用下能发出 Eu³⁺的荧光特征峰和产生较强的荧光强度,在乳化剂 OP-10 的作用下,其荧光强度可进一步得到增强。本研究将这一荧光增强机理用于鸭肉中 OTC 残留量的检测。首先分别对 AgNPs 加入量、Eu³⁺加入量、乳化剂 OP-10 和反应时间对 OTC+Eu+AgNPs+OP-10+duck extract 体系的荧光强度影响进行了分析,以确定最佳实验条件;然后建立了预测鸭肉中 OTC 残留量的标准曲线,为鸭肉中 OTC 残留的快速检测打下了良好的基础。

2 实验材料与amp;方法

2.1 材料与试剂

实验材料与试剂主要有:麻鸭(购于江西农业

大学菜市场);OTC 标准品(纯度为 98.7%,购于中国标准物质网);硝酸镧(Eu(NO₃)₃);硝酸银(AgNO₃);硼氢化钠(NaBH₄);柠檬酸三钠;乳化剂 OP-10;实验用水为超纯水。

2.2 仪器设备

实验用设备主要有:Cary Eclipse 荧光分光光度计(Varian, Inc., USA);实验室超纯水机(湖南科尔顿水务有限公司);JK-50B 型超声波清洗器(合肥金尼克机械有限公司);FA1004B 型电子天平(精度为 0.1 mg,上海上平仪器有限公司);智能恒温磁力搅拌器(郑州亚荣仪器有限公司);1 cm 的石英比色皿;HH-6 型数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器厂);JJ-2B 型组织捣碎匀浆机(江苏省金南仪器厂)。

2.3 实验步骤

(1)配置 Eu(NO₃)₃ 溶液。称取 223 mg Eu(NO₃)₃,用超纯水定容至 10 mL,得到 50 mmol/L 的 Eu(NO₃)₃ 溶液。

(2)配置乳化剂 OP-10。取 10 mL 乳化剂 OP-10 胶状液体,用 70 mL 乙醇稀释,超声振荡 30 min,待其温度降低后,再用乙醇定容至 100 mL,得到乳化剂 OP-10 溶液。

(3)配置 OTC 标准储备液。称取 10 mg 的 OTC 标准品,用一定量的超纯水溶于 100 mL 棕色容量瓶中,超声溶解后再定容至刻度,即可得到 100 mg/L 的 OTC 标准储备液。

(4)配置 AgNPs^[10]。首先分别称取 17 mg 的 AgNO₃ 溶解于 10 mL 的去离子水中,1 470 mg 的柠檬酸三钠溶解于 10 mL 去离子水中;然后取 1 mL 的 AgNO₃ 溶液和 1 mL 的柠檬酸三钠溶液加入到 47 mL 去离子水中,搅拌,在室温下放置 10 min;再称取 3.8 mg 的 NaBH₄ 溶解于 100 mL 的去离子水中;最后取 600 μL 的 NaBH₄ 溶液滴加到上述配制的溶液中,快速搅拌 30 min,在 4 °C 的环境下放置一晚后使用。

(5)取 200 g 鸭胸脯肉用组织捣碎匀浆机充

分捣碎均匀,装入洁净容器中,密封,并标明标记,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻存放。称取均质试样 5 g (精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,分别用约 $20, 20, 10\text{ mL}$ 的 0.1 mol/mL EDTA-Mcllvainc 缓冲液冰水浴超声提取 3 次,每次漩涡混合 1 min ,超声提取 10 min , $3\ 000\text{ r/min}$ 离心 5 min (温度低于 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$);然后合并上清液,并定容至 50 mL ,混匀, $5\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min (温度低于 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$)后用快速滤纸过滤。用 NaOH 调节鸭肉提取液的 pH 值至 10 。

(6)分别取不同体积的 OTC 标准储备液于 10 mL 棕色容量瓶中,并用不同量的鸭肉提取液定容,得到 17 个不同 OTC 含量($0.05\sim 20\text{ mg/L}$)的鸭肉提取液样本。

(7)将 0.1 mL AgNPs 和 1 mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液加入到石英比色皿中,混合均匀后再加入 1.5 mL 待测液(不同 OTC 含量的鸭肉提取液)和 1 mL OP-10,混合均匀后置入石英比色皿中, 5 min 后采集其荧光光谱。

(8)采集荧光光谱及设置参数。激发波长为 380 nm , Emission filter 参数设置为 $360\sim 1\ 100\text{ nm}$, 10 nm 的激发与发射狭缝, 700 V 的光电倍增管(PMT)探测器电压,中等扫描速度, moving average 平滑方式。

3 结果与分析

3.1 样本的荧光光谱特性

OTC 中含有 β -二酮结构,它能够作为天线分子吸收能量并通过分子内能量转移给 Eu^{3+} 和发出 Eu^{3+} 的荧光特征峰^[12]。如图 1 所示,和 OTC+Eu 体系相比,在 AgNPs 和乳化剂 OP-10 作用下形成的 OTC+Eu+AgNPs+OP-10 体系的荧光强度得到了明显加强。因此,本研究应用该荧光增强机理来测定鸭肉中的 OTC 残留量。

图 2 给出了 OTC+Eu+AgNPs+ duck meat extract 和 OTC+Eu+AgNPs+OP-10+ duck meat extract 2 种体系的荧光光谱。由图 2 可知,后一体系在 617 nm 处的荧光强度更强。这可能是因为乳化剂 OP-10 可减少荧光分子之间的相互碰撞、提高荧光效率和抑制荧光猝灭。

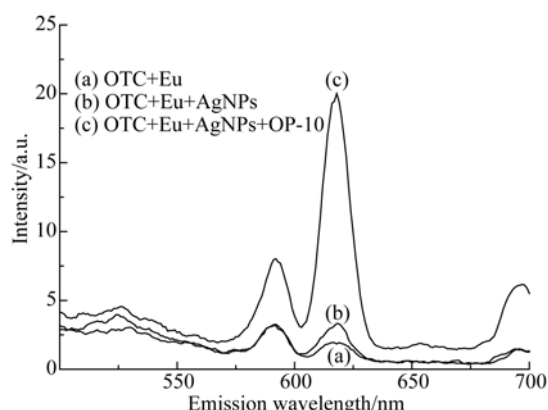


图 1 OTC+Eu, OTC+Eu+AgNPs 和 OTC+Eu+AgNPs+OP-10 体系的荧光光谱图

Fig. 1 Fluorescence spectra of OTC+Eu, OTC+Eu+AgNPs and OTC+Eu+AgNPs+OP-10

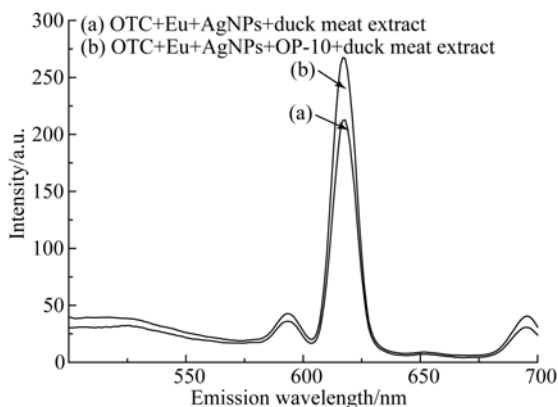


图 2 OTC+Eu+AgNPs+ duck meat extract 和 OTC+Eu+AgNPs+OP-10+ duck meat extract 体系的荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescence spectra of OTC+Eu+AgNPs+ duck meat extract and OTC+Eu+AgNPs+OP-10+ duck meat extract

3.2 AgNPs 加入量对荧光强度的影响

为分析 AgNPs 加入量对 OTC+Eu+AgNPs+OP-10+duck meat extract 组成的混合溶液体系的荧光强度的影响,本研究分别取不同体积($0.05, 0.1, 0.15, 0.2$ 和 0.25 mL)的 AgNPs 与 0.03 mL $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液混合均匀,然后加入 1.5 mL 含 10 mg/L OTC 的鸭肉提取液和 1 mL 乳化剂 OP-10,得到在荧光波长为 617 nm 处的荧光强度,如图 3 所示。从图 3 可以看出, 617 nm 处的荧光强度随 AgNPs 加入量的增加呈先增强后减弱的趋势,且 AgNPs 加入量为 0.1 mL 时, 617 nm 处的荧光强度最强,因此确定 0.1 mL 为本研究中的 AgNPs 加入量。当 AgNPs 加入量

大于 0.1 mL 时,617 nm 处特征峰的荧光强度下降,其原因可能是过量的 AgNPs 会产生团聚,使荧光强度下降。

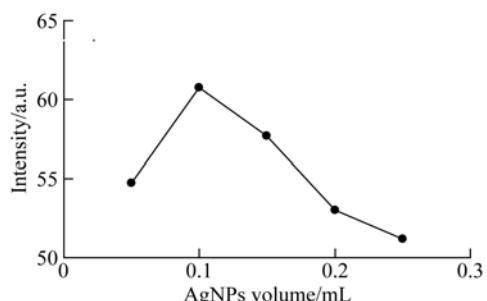


图 3 AgNPs 加入量对光谱强度的影响

Fig. 3 Effect of addition amount of AgNPs on fluorescence intensity

3.3 Eu^{3+} 加入量对荧光强度的影响

Eu^{3+} 加入量是影响 OTC + Eu + AgNPs + OP-10 + duck meat extract 组成的混合溶液体系的荧光强度的一个重要因素。本研究中 AgNPs 加入量为 0.1 mL、含 10 mg/L OTC 的鸭肉提取液加入量为 1.5 mL 和乳化剂 OP-10 加入量为 1 mL,考查了不同 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 溶液加入量(0.1, 0.4, 0.7, 1, 1.3, 1.5 和 2 mL)时 617 nm 处的荧光强度,其中不同试剂的加入顺序与实验方法中的步骤(7)相同。从图 4 可以看出,617 nm 处的荧光强度随 Eu^{3+} 加入量的增加呈先增强后减弱的趋势;当 Eu^{3+} 加入量为 1 mL 时,617 nm 处的荧光强度最强,因此本研究确定 Eu^{3+} 加入量为 1 mL。当 Eu^{3+} 加入量大于 1 mL 时,617 nm 处特征峰的荧光强度下降可能是因为过量的 Eu^{3+} 会使 AgNPs 发生团聚现象,使荧光强度下降。

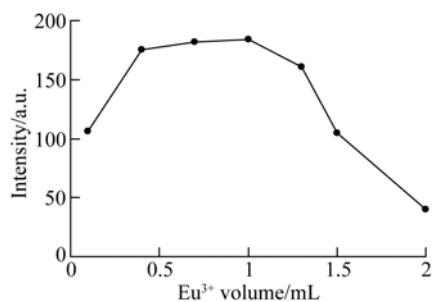


图 4 Eu^{3+} 加入量对光谱强度的影响

Fig. 4 Effect of addition amount of Eu^{3+} on fluorescence intensity

3.4 乳化剂 OP-10 加入量对荧光强度的影响

乳化剂 OP-10 的加入量是影响荧光强度的重要因素之一。本实验研究了不同乳化剂 OP-10 加入量(0.5, 1, 1.5, 2 和 2.5 mL)条件下 617 nm 处荧光强度的变化趋势,结果如图 5 所示。其中, AgNPs、 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 和 10 mg/L OTC 的鸭肉提取液的加入量分别为 0.1, 1 和 1.5 mL。从图 5 可以看出,617 nm 处的荧光强度随乳化剂 OP-10 加入量的增加呈先增强后减弱的趋势;当乳化剂 OP-10 加入量为 1 mL 时,617 nm 处的荧光强度最大,因此,本研究选择乳化剂 OP-10 的加入量为 1 mL。

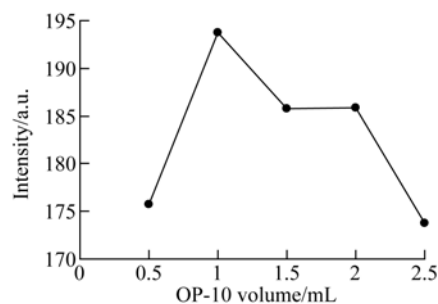


图 5 OP-10 加入量对光谱强度的影响

Fig. 5 Effect of addition amount of OP-10 on fluorescence intensity

3.5 反应时间对荧光强度影响

在室温条件下,考察了在最佳实验条件下(AgNPs、 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ 、含某一浓度 OTC 的鸭肉提取液和乳化剂 OP-10 的加入量分别为 0.1, 1, 1.5 和 2 mL)光谱强度随反应时间的变化情况。从图 6 可以看出,体系在 1 min 后完全反应,20 min 内在 617 nm 处的光谱强度值基本保持稳定,因此,本研究选择在 5 min 时开始采集样本的荧光光谱。

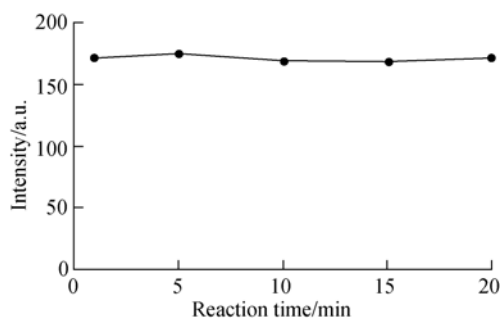


图 6 反应时间对光谱强度的影响

Fig. 6 Effect of reaction time on fluorescence intensity

3.6 标准曲线的确定与预测结果

在本研究得到的最佳实验条件下,得到了如图 7 所示的含不同浓度 OTC 的鸭肉提取液的荧光光谱。从图 7 可以看出,出现了 3 个比较明显的荧光特征峰,其强度随 OTC 含量的增加都呈增强趋势。比较这 3 个荧光特征峰可知,617 nm 处的荧光强度随 OTC 含量增加而增强的趋势最明显,且在 OTC 浓度较低时荧光特征峰仍然比较明显。因此,本研究选择 617 nm 处的荧光特征峰进行分析研究。

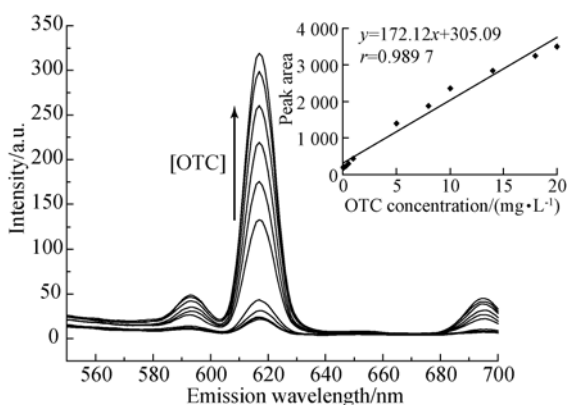


图 7 不同 OTC 含量的鸭肉提取液的荧光光谱,插图为 OTC 浓度与 617 nm 处峰面积之间的线性关系

Fig. 7 Fluorescence spectra of duck meat extract containing different OTC concentrations, the inset shows linear relationship between OTC concentration and peak area at 617 nm

应用 OriginPro 8.5 计算 617 nm 特征峰下的峰面积,建立了 OTC 质量浓度与 617 nm 处峰面积之间的关系曲线,如图 7 中的插图所示。由插图可知,线性回归方程为 $y=172.12x+305.09$,线性相关系数 r 为 0.989 7,检出限为 0.05 mg/L,低于文献[1]中所规定的鸭肉中 OTC 残留量的要求。这说明鸭肉提取液中 OTC 质量浓度为 0.05~20 mg/L 时,鸭肉提取液中 OTC 的质量浓度与 617 nm 处峰面积之间呈良好的线性关

参考文献:

- [1] GB16869-2005. 鲜、冻禽产品[S].
GB16869-2005. Fresh and frozen poultry product [S]. (in Chinese)
[2] PHAM K D, DEGAND G, DANYI S, et al.. Vali-

系。其中, x 为鸭肉提取液中 OTC 质量浓度, y 为 617 nm 处峰面积。应用得到的标准曲线预测含不同质量浓度 OTC 的鸭肉提取液,得到如图 8 所示的鸭肉提取液中 OTC 含量测定中预测值与实测值之间的关系,其预测集的 r 为 0.996 6,预测均方根误差(RMSEP)为 0.622 3 mg/L。

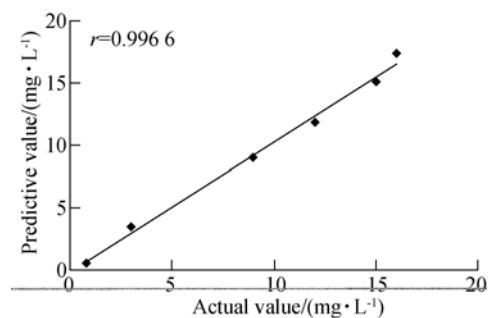


图 8 鸭肉提取液中 OTC 含量测定中预测值与实测值之间的关系

Fig. 8 Relationship between actual and predictive values of OTC contents in duck meat extract

4 结 论

在 AgNPs 和乳化剂 OP-10 的作用下,OTC 与 Eu(III) 生成的配合物可产生较强的荧光强度,本研究将这一荧光增强机理用于鸭肉中 OTC 的检测。首先分别分析了 AgNPs 加入量、Eu³⁺ 加入量、乳化剂 OP-10 和反应时间对 OTC+Eu+AgNPs+OP-10+duck meat extract 体系的荧光强度的影响,确定了最佳实验条件:AgNPs 加入量为 0.1 mL、Eu³⁺ 加入量为 1 mL、乳化剂 OP-10 加入量为 1 mL。然后建立了 OTC 质量浓度与 617 nm 处峰面积之间的线性回归方程为 $y=172.12x+305.09$,线性相关系数 r 为 0.989 7,检出限为 0.05 mg/L,预测集的 r 为 0.996 6,预测均方根误差(RMSEP)为 0.623 3 mg/L。实验结果表明,本研究方法可满足鸭肉中 OTC 残留量的快速测定要求。

- dation of a two-plate microbiological method for screening antibiotic residues in shrimp tissue[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 672 (1-2): 30-39.
[3] NAGEL O G, BELTRAN M C, MOLINA M P, et al.. Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk[J]. *Small Ruminant Research*,

- 2012, 102(1): 26-31.
- [4] YAN X D, HU X ZH, ZHANG H C, *et al.*. Direct determination of furaltadone metabolite, 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, in meats by a simple immunoassay[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2012, 23(3): 203-215.
- [5] LI J, LIU J, ZHANG H C, *et al.*. Broad specificity indirect competitive immunoassay for determination of nitrofurans in animal feeds[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 678 (1): 1-6.
- [6] ZHOU Y, LI CH Y, LI Y S, *et al.*. Monoclonal antibody based inhibition ELISA as a new tool for the analysis of melamine in milk and pet food samples[J]. *Food Chemistry*, 2012, 15(4):2681-2686.
- [7] MOHAMMAD M K, SANG H L, HYUN S L, *et al.* A batch chemiluminescence determination of enoxacin using a tris-(1,10-phenanthroline) ruthenium (II)-cerium(IV) system [J]. *J. Fluores.*, 2006, 16(4): 535-540.
- [8] PIKKEMAAT M G. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals [J]. *Anal. Bioanal Chem.*, 2009, 395:893-905.
- [9] 徐良敏,张焕勤. 纳米金胶体对吡啶橙水溶液的荧光增强效应[J]. 宁夏师范学院学报:自然科学, 2010, 31(12):31-35.
- XU L M, ZHANG H Q. Surface enhanced fluorescence of gold NPs to acridine orange molecules[J]. *Journal of Ningxia Teachers University: Natural Science*, 2010, 31(12):31-35. (in Chinese)
- [10] 吕凤婷,郑海荣,房喻. 表面增强荧光研究进展[J]. 化学进展, 2007, 19(2):257-266.
- LÜ F R, ZHENG H T, FANG Y. Studies of surface-enhanced fluorescence[J]. *Progress in Chemistry*, 2007, 19(2):257-266. (in Chinese)
- [11] HONG L T, YANG CH. Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium(III) for detection of tetracycline in milk [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 173(1):262-267.
- [12] 张立伟,罗黎,江崇球,等. 2,6-二乙氧基-β-环糊精对铕(III)-强力霉素络合物包合作用的研究及其分析应用[J]. 分析化学, 2008, 36(11):1547-1550.
- ZHANG L W, LUO L, JIANG CH Q, *et al.*. Spectrofluorimetric determination of trace doxycycline with diethyl-O-β-cyclodextrin-doxycycline-Eu³⁺ System [J]. *Chinese Journal of Analytical chemistry*, 2008, 36(11):1547-1550. (in Chinese)

作者简介:



赵进辉(1978—),男,湖南华容人,博士,副教授,2008年于华南农业大学获得博士学位,主要从事光谱分析与检测方面的研究。E-mail: zjhxiaocao@sina.com

通讯作者:



刘木华(1969—),男,江西宁都人,博士,教授,2001年于中国农业大学获得博士学位,2004年于江苏大学博士后出站,主要从事光谱分析与检测方面的研究。E-mail: suikelum@sina.com